

平成 27 年 4 月 15 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670056

研究課題名(和文)血管内皮細胞特異的レセプターRobo4をターゲットとした新規敗血症治療戦略の確立

研究課題名(英文)A novel anti-inflammatory strategy by targeting endothelial cell-specific receptor, Robo4

研究代表者

岡田 欣晃(Okada, Yoshiaki)

大阪大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50444500

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：敗血症は全身性炎症反応症候群であり、高率で死に至る重篤な疾患である。現在効果的な治療はなく、発症メカニズム解明と新規治療法確立が急務となっている。我々はこれまでに、血管内皮細胞特異的受容体Robo4のノックアウトが、敗血症下のマウスの生存率を上昇させることを見出している。本研究ではこのメカニズムについての解析を行い、Robo4の発現抑制が、血管内皮細胞からのIL-6をはじめとする炎症性サイトカインの産生を抑制し、敗血症における炎症を抑制することを明らかにした。また、敗血症治療薬開発に向け、Robo4結合抗体およびRobo4発現抑制アンチセンス核酸を作製した。

研究成果の概要(英文)：Roundabout 4 (Robo4) is a transmembrane receptor that is specifically expressed in endothelial cells. We have previously found that Robo4-deficient mice in sepsis showed improved survival rates after LPS injection. However, the mechanism was not well understood. In this study, we found that the depletion of Robo4 inhibits production of inflammatory cytokines, including IL-6, from endothelial cells and alleviates the sepsis phenotype. To establish a new anti-sepsis strategy by targeting Robo4, we generated antibodies against Robo4 and anti-sense oligonucleotides that inhibit expression of Robo4.

研究分野：血管生物学

キーワード：血管内皮細胞 敗血症 炎症 Robo4

1. 研究開始当初の背景

敗血症は全身性炎症反応症候群である。細菌などの感染が局所で抑えられず全身に波及してしまうこの疾患においては、白血球の異常活性化により炎症性サイトカインが血中に大量放出される(サイトカインストーム)。この結果、無治療状態ではショック、血栓形成、多臓器不全などが誘導され、患者は高率で死に至る。現在、世界的治療ガイドライン(Surviving sepsis campaign guideline)が策定され、抗生物質やステロイドを用いた免疫細胞活性化を抑制する治療が提唱されているが、必ずしも効果的ではない。このため敗血症発症メカニズムの詳細解明と、その病態を効果的に抑制する新規治療戦略の開発が急務となっている。

我々は、血管内皮細胞に特異的に発現するレセプターRobo4に着目した研究において、Robo4 ノックアウトマウスが敗血症に優位な抵抗性を示すという興味深い知見を見出した。具体的には、2種の敗血症モデルに対し、Robo4 ノックアウトマウスが野生型より高い生存率を示すことを発見し、Robo4 が敗血症発症に寄与することが示唆された。

2. 研究の目的

(1) Robo4 ノックアウトマウスが敗血症に高い抵抗性を示すメカニズムを解明する。敗血症下のRobo4 ノックアウトマウスにおいては、VEGFやIL-6などの炎症性サイトカインの過剰産生が抑制されている。この結果から、Robo4 のノックアウトはサイトカインストームの抑制を介して敗血症抵抗性を誘導することが示唆された。そこで、血管内皮細胞におけるRobo4のノックアウトが炎症性サイトカイン産生および、内皮細胞の炎症応答に与える影響について解析を行う。

(2) Robo4 のノックアウトはマウスの敗血症抵抗性を高める。このことは、Robo4 の発現・機能抑制が、敗血症治療の新戦略となる可能性を示している。そこで、本戦略による敗血症治療戦略の可能性を検証するために、Robo4 結合抗体、および Robo4 発現抑制核酸の開発を行う。

3. 研究の方法

(1) Robo4 ノックアウトがサイトカインストームを抑制するメカニズムを解析するため、IL-6 過剰産生抑制のメカニズムの解明を行った。IL-6 は内皮細胞やマクロファージなどの細胞で産生されるため、Robo4 が内皮細胞からの IL-6 産生に与える影響について検討を行った。ヒト内皮細胞(HUVEC)に Robo4 siRNA を導入後、LPS を4時間処理し、IL-6 の mRNA 発現量とタンパク質分泌量をリアルタイム RT-PCR および ELISA により解析した。また、Robo4 ノックダウンが内皮細胞の他の炎症応答因子に与える影響についても

リアルタイム RT-PCR により解析した。

(2) Robo4 結合抗体と Robo4 発現抑制核酸の開発を行った。Robo4 結合抗体については、ファージディスプレイ法を用いて連携研究者により作製された2種の抗体、および3種の市販抗体を準備し、これらがLPS刺激下の内皮細胞における IL-6 産生に影響を与えるかを評価した。

また、Robo4 発現抑制核酸については、マウス Robo4 siRNA および Robo4 mRNA に結合し翻訳阻害する人工核酸 Bridged nucleic acid (BNA) を含む10種のアンチセンス核酸(AS1~AS10)を合成し、Robo4 発現抑制効果の高い核酸を選別した。得られた核酸をマウスに投与し、in vivo での Robo4 発現抑制効果を検証した。

4. 研究成果

(1) Robo4 をノックダウンが内皮細胞からの IL-6 産生に与える影響を解析した。ヒト内皮細胞(HUVEC)に Robo4 siRNA を導入したところ、LPS が誘導する IL-6 mRNA 産生増加が顕著に抑制された(図1)。また ELISA を用いた分泌 IL-6 量の解析においても、同様の抑制効果がみられた。これらの結果から、Robo4 ノックアウトマウスにおける IL-6 過剰産生抑制の一つのメカニズムが、内皮細胞からの IL-6 産生抑制であることが明らかになった。

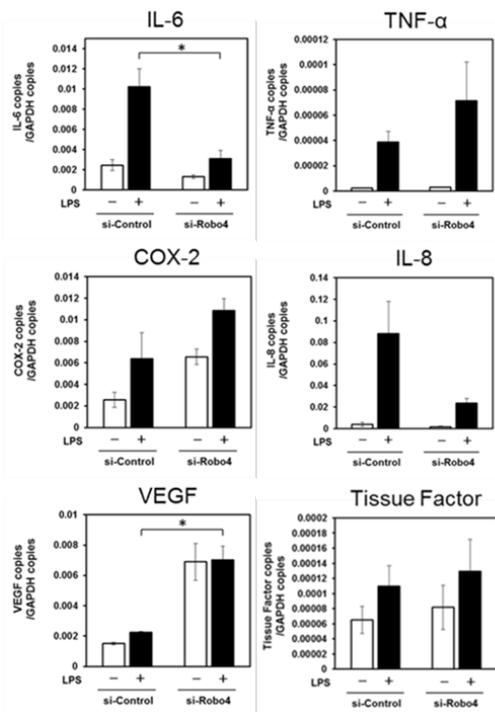


図1 LPS 刺激した Robo4 ノックダウン内皮細胞における炎症関連遺伝子の mRNA 発現量 (\*p<0.05 vs. si-Control)

また、IL-6 以外の炎症応答遺伝子についても発現量の解析を行ったところ、Robo4 のノックダウンは、必ずしもすべての炎症応答遺

伝子発現を抑制せず、一部の遺伝子の発現を増加させた。(図1)本結果から、Robo4のノックダウンは内皮細胞の炎症応答を完全に抑制するわけではなく、IL-6、IL-8など一部の炎症応答遺伝子の発現のみ抑制することが示された。

(2) Robo4に結合する5種の抗体を準備し、これらが炎症下の内皮細胞におけるIL-6産生に与える影響を解析した。LPSで処理したHUVECにおけるIL-6産生量に各抗体が与える影響を評価したところ、全ての抗体はIL-6産生に影響を与えなかった。この結果から今回準備した抗体は、炎症下の内皮細胞からのIL-6産生を抑制する効果を持たないことが示された。

次に、Robo4発現抑制核酸としてin vivoでRobo4発現を効率的に抑制するsiRNAの選別を行った。まず、マウスRobo4を抑制する可能性のある4種のsiRNAを、マウス内皮細胞株MS1細胞に導入した。その結果、4種すべてのsiRNAが、Robo4 mRNA発現を80%以上抑制した。そこで、このsiRNAのin vivoにおけるRobo4抑制効果を検証するために、最も抑制効果の高かったRobo4 siRNAをマウスに投与した。その結果、肺血管におけるRobo4 mRNAの発現は、投与6時間後には抑制されていたものの、24時間後には投与前と同レベルにまで回復していた(図2)。これらの結果から、siRNAでRobo4発現を抑制できるものの、長時間の抑制は難しいことが示唆された。

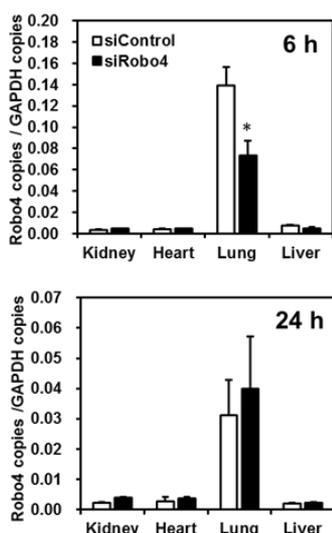


図2 siRNA投与6時間後、24時間後のマウスの各臓器でのRobo4 mRNA量の解析 (\* $p < 0.05$  vs. Control)

そこで長時間のRobo4発現抑制効果を持つ核酸の開発を目的とし、酵素耐性と抑制効果にすぐれた人工核酸BNAを含む10種のアンチセンス核酸を設計、合成した。得られた核酸をヒトおよびマウス内皮細胞(HUVEC、MS-1細胞)導入しその機能を評価したところ、AS-10が両細胞におけるRobo4発現を抑制することが明らかになった。さらにAS-10

のマウスへの投与は、肺におけるRobo4発現を投与24時間後まで持続的に抑制する傾向がみられた。これらの結果から、Robo4発現抑制による新規敗血症治療戦略確立のための候補分子としてAS-10を同定することができた。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

Okada Y, Funahashi N, Tanaka T, Nishiyama Y, Yuan L, Shirakura K, Turjman AS, Kano Y, Naruse H, Suzuki A, Sakai M, Zhixia J, Kitajima K, Ishimoto K, Hino N, Kondoh M, Mukai Y, Nakagawa S, Garcia-Cardena G, Aird WC, Doi T. Endothelial cell-specific expression of roundabout 4 is regulated by differential DNA methylation of the proximal promoter. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014;34(7):1531-8. (査読有)  
DOI: 10.1161/ATVBAHA.114.303818.

Okada Y. Regulation of endothelial cell-specific Robo4 gene expression by DNA methylation and non-lineage specific transcription factors. *Yakugaku Zasshi.* 2014;134(7):817-21. (査読有)  
DOI: 10.1248/yakushi.13-00258

Okada Y, Watanabe M, Nakai T, Kamikawa Y, Shimizu M, Fukuhara Y, Yonekura M, Matsuura E, Hoshika Y, Nagai R, Aird WC, Doi T. RUNX1, but not its familial platelet disorder mutants, synergistically activates PF4 gene expression in combination with ETS family proteins. *J Thromb Haemost.* 2013;11(9):1742-50. (査読有)  
DOI: 10.1111/jth.12355.

Yoshikawa M, Mukai Y, Okada Y, Tsumori Y, Tsunoda S, Tsutsumi Y, Aird WC, Yoshioka Y, Okada N, Doi T, Nakagawa S. Robo4 is an effective tumor endothelial marker for antibody-drug conjugates based on the rapid isolation of the anti-Robo4 cell-internalizing antibody. *Blood.* 2013;121(14):2804-13. (査読有)  
DOI: 10.1182/blood-2012-12-468363.

[学会発表](計14件)

岡田欣晃、血管内皮細胞特異的レセプターRobo4の発現制御メカニズムの解析、第14回Pharmaco-Hematologyシンポジウム、2013年6月1日、日本薬学会長井記念ホール(東京)

酒井美貴、真鍋詩織、山本奈那、岡田欣晃、土井健史、血管内皮細胞特異的受容

体 Robo4 の IL-6 産生への寄与の解析—  
敗血症発症メカニズムの解析—、第 63  
回日本薬学会近畿支部総会・大会、2013  
年 10 月 12 日、同志社女子大学京田辺キ  
ャンパス（京都）

柿内康司、西山侑児、鈴木綾乃、舟橋伸  
昭、岡田欣晃、土井健史、Robo4 プロモ  
ーターの組織特異的な DNA メチル化パ  
ターンが決定されるメカニズムの解析  
—DNA メチル化による血管内皮細胞特  
異的な遺伝子発現制御—、第 63 回日本  
薬学会近畿支部総会・大会、2013 年 10  
月 12 日、同志社女子大学京田辺キャン  
パス（京都）

真鍋詩織、酒井美貴、山本奈那、Aird WC、  
岡田欣晃、土井健史、血管内皮細胞特異  
的受容体 Robo4 のノックダウンが炎症  
応答遺伝子発現に与える影響の解析、  
2014 年 3 月 28 日 日本薬学会第 134 年会  
（熊本）

田中亨、Aird WC、岡田欣晃、土井健史  
Robo4 近位プロモーターの DNA メチル  
化の Robo4 遺伝子発現への寄与 2014 年  
3 月 28 日、日本薬学会第 134 年会（熊本）

山本奈那、酒井美貴、真鍋詩織、Aird WC、  
山本剛史、小比賀聡、岡田欣晃、土井健  
史、血管内皮細胞特異的受容体 Robo4 の  
発現抑制核酸を用いた敗血症治療の可  
能性、2014 年 3 月 28 日、日本薬学会第  
134 年会（熊本）

白倉圭佑、山内沙織、Aird WC、岡田欣  
晃、土井健史、血管内皮細胞特異的受容  
体 Robo4 の過剰発現が炎症応答に及ぼ  
す影響の解析、2014 年 3 月 30 日、日本  
薬学会第 134 年会（熊本）

Yoshiaki Okada, Nobuaki Funahashi, Yuji  
Nishiyama, Toru Tanaka, Keisuke Shirakura,  
Yusuke Maniwa, William C. Aird, Takefumi  
Doi、DNA methylation of the proximal  
promoter regulates endothelial cell-specific  
Robo4 gene expression、The 18th  
International Vascular Biology Meeting、  
2014 年 4 月 14 日、みやこめっせ（京都）

白倉圭佑、酒井美貴、福島優、真鍋詩織、  
William Aird、岡田欣晃、土井健史、血管  
内皮細胞特異的受容体 Robo4 の炎症応  
答における役割、第 15 回  
Pharmac-Hematology シンポジウム、  
2014 年 5 月 24 日、名古屋市立大学大  
学院薬学研究科（愛知）

Keisuke Shirakura, Miki Sakai, Yu  
Fukushima, Shiori Manabe, William C. Aird,

Yoshiaki Okada, Takefumi Doi, Roles of  
Endothelial cell specific receptor, Robo4 in  
inflammatory response、第 8 回 SKO シン  
ポジウム、2014 年 6 月 10 日、大阪大学  
銀杏会館（大阪）

真鍋詩織、山本奈那、Aird WC、岡田欣  
晃、土井健史、Robo4 発現抑制による炎  
症抑制機構の解析と敗血症治療薬開発  
への応用、第 64 回日本薬学会近畿支部  
総会・大会、2014 年 10 月 11 日、京都薬  
科大学（京都）

山内沙織、白倉圭佑、William C Aird、岡  
田欣晃、土井健史、血管内皮細胞特異的  
受容体 Robo4 の血管透過性制御におけ  
る役割、第 64 回日本薬学会近畿支部総  
会・大会、2014 年 10 月 11 日、京都薬科  
大学（京都）

岡田欣晃、血管内皮細胞特異的受容体  
Robo4 の敗血症治療標的としての可能性、  
日本血管生物医学会若手研究会、2015  
年 2 月 6 日、東京大学（東京）

岡田欣晃、William Aird、土井健史、血管  
内皮細胞特異的な遺伝子発現と DNA メ  
チル化、日本薬学会第 135 年会、2015  
年 3 月 26 日、神戸学院大学（兵庫）

〔図書〕（計 0 件）  
該当なし

〔産業財産権〕  
出願状況（計 0 件）  
該当なし

取得状況（計 0 件）  
該当なし

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.phs.osaka-u.ac.jp/homepage/b018/>

## 6. 研究組織

(1)研究代表者  
岡田 欣晃（OKADA, Yoshiaki）  
大阪大学・大学院薬学研究科・准教授  
研究者番号：5 0 4 4 4 5 0 0

(2)連携研究者  
小比賀 聡（OBICA, Satoshi）  
大阪大学・大学院薬学研究科・教授  
研究者番号：8 0 2 4 3 2 5 2

向 洋平（MUKAI, Yohei）  
独立行政法人医薬基盤研究所・サブプロジ  
ェクトリーダー  
研究者番号：6 0 4 4 4 5 0 1